# 棉蚜抗氧化乐果品系及敏感品系羧酸酯酶性质的比较

孙鲁娟，高希武*，郑炳宗
（中国农业大学植物保护学院，北京　100094）

**摘要**：在室内用氧化乐果逐代筛选的棉蚜抗性品系，相对于敏感品系的抗性倍数是17。用α-乙酸萘酯（α-NA）、α-丁酸萘酯（α-NB）、α-磷酸萘酯（α-NP）和β-磷酸萘酯（β-NP）作底物比较研究了氧化乐果抗性和敏感品系棉蚜 *Aphis gossypii* 羧酸酯酶的比活力、米氏常数（$K_m$）和最大反应速度（$V_{max}$）等有关的动力学常数。以α-NA和α-NB作底物时，抗性品系棉蚜的比活力显著低于敏感品系的；以α-NP和β-NP作底物时，两个品系棉蚜的比活力、$K_m$ 和 $V_{max}$ 没有明显差异。用α-NA、β-NA作底物染色做酯酶同工酶电泳，抗性品系棉蚜的酯酶同工酶染色比敏感品系棉蚜的浅。

**关键词**：棉蚜；抗药性；羧酸酯酶
**中图分类号**：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）06-0724-04

# Characteristics of carboxylesterase in omethoate-resistant and susceptible strains of cotton aphid，*Aphis gossypii*

SUN Lu-Juan，GAO Xi-Wu*，ZHENG Bing-Zong（College of Plant Protection，China Agricultural University，Beijing 100094，China）

**Abstract**: A strain of organophosphate（OP）-resistant cotton aphid，*Aphis gossypii* was selected by exposure to omethoate insecticide in the laboratory. The resistance factor of this strain was 17 times that of an OP-susceptible strain of cotton aphid. Four substrates，α-naphthyl acetate（α-NA），α-naphthyl butyrate（α-NB），α-naphthyl phosphate（α-NP）and β-naphthyl phosphate（β-NP），were used to determine carboxylesterase activity，Michaelis constants（$K_m$）and maximum velocities（$V_{max}$）in OP-susceptible and resistant strains of cotton aphids. Carboxylesterase activity was significantly lower in the OP-resistant strain than the OP-susceptible strain when α-NA and β-NB were used as substrates and the same trends were obtained by native polyacrylamide gel electrophoresis（PAGE）analysis. However，no significant difference was found between OP-susceptible and resistant strains when α-NP and β-NP were used as substrates.

**Key words**: *Aphis gossypii*；insecticide resistance；carboxylesterase

棉蚜 *Aphis gossypii* 是我国北部棉区棉花及瓜类的主要害虫之一，对棉蚜的防治，长期大量使用有机磷杀虫剂。早在1964年就报道棉蚜对内吸磷、对硫磷产生了严重的抗性，抗药性高达23～148倍（龚坤元等，1964）。在70年代棉蚜对乐果、磷胺和西维因也产生了抗药性（唐振华，1983）。近年来不少研究者对田间抗有机磷杀虫剂棉蚜的生化机理进行了广泛的研究（孙耘芹等，1987；郑炳宗等，1989；高希武和郑炳宗，1990）。多数研究表明羧酸酯酶活性的升高是棉蚜对有机磷杀虫剂产生抗性的机制之一，但也有学者认为抗性与酯酶活性的升高没有明显的规律可循（Silver，1984）。本实验采用多种底物测定抗性和敏感棉蚜品系的动力学常数，研究了棉蚜对有机磷杀虫剂抗性与酯酶活性之间的关系。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验材料与试剂

棉蚜敏感品系由新疆石河子大学张东海先生提供，抗性品系采自廊坊棉田并在室内一直用氧化乐果筛选获得。

---

基金项目：国家重大基础研究计划“973”项目（G2000016207）；植物病虫害国家重点实验室开放课题资助项目
作者简介：孙鲁娟，女，1975年3月生，博士，研究方向为昆虫毒理学，E-mail：sunw1212@sohu.com
＊通讯作者 Author for correspondence，E-mail：gaoxiwu@263.net.cn
收稿日期 Received：2002-01-16；接受日期 Accepted：2002-04-02

α-乙酸萘酯（α-NA）（分析纯）、α-萘酚（分析纯）购自上海化学试剂公司；α-丁酸萘酯（α-NB）、α-磷酸萘酯（α-NP）、β-磷酸萘酯（β-NP）购自 Sigma 化学试剂公司；固蓝 RR 盐（Fluka 进口，上海化学试剂公司分装）、考马斯亮蓝 G-250（Fluka 进口，上海化学试剂公司分装）购自北京欣经科生物技术公司；40%氧化乐果乳油为中国人民解放军 9715 工厂生产。

### 1.2 实验方法

**1.2.1** 生物测定：用 0.05%（v/v）Triton X-100 溶液将 40%氧化乐果乳油稀释成系列浓度。以含 0.05%（v/v）Triton X-100 的水作对照。取室内种植未接触过药剂的棉叶在药液中浸渍 5 s 取出，挂在阴凉处晾干后，插在盛有营养液的试剂瓶中。用毛笔将无翅成蚜接在棉叶上。每浓度至少接 50 头，重复 3 次，放入 25℃培养箱中，检查 24 h 死亡数。用 POLO 软件计算 $LC_{50}$ 值。

**1.2.2** 酶液制备：挑取各品系无翅成蚜各 1 500 头，加入 15 mL 提取液（50 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-Cl，pH 7.0，1 $mmol \cdot L^{-1}$ EDTA，15%蔗糖，0.5% Triton X-100），冰浴条件下匀浆，在 4℃，12 000 × g 离心 30 min，上清液作为酶源，将其分装，置于 －20℃条件下储存。根据品系和底物类型稀释 100～500 倍用于测定酶活性。

**1.2.3** 棉蚜羧酸酯酶比活力的测定：以不同底物测定羧酸酯酶的比活力参照 van Aspern（1962）的方法并稍加修改。以 α-NA 或 α-NB 为底物测定时，反应混合液为 1.5 mL，含 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ pH 7.0的磷酸缓冲液 175 μL，1.25 mL $3 \times 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$ 底物（含 $10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$ 的毒扁豆碱）及 75 μL 稀释的酶液；以 α-NP 或 β-NP 为底物测定时，反应混合液为 1.5 mL，含 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ pH 7.0 的磷酸缓冲液 50 μL，1.25 mL $3 \times 10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$ 底物及 200 μL 未稀释的酶液。30℃水浴 30 min 后，加入 250 μL 显色剂（1%固蓝 BB 盐和 5% SDS 按 2∶5 混合）终止反应，静止 10 min 后在 600 nm 下比色。

**1.2.4** 羧酸酯酶的米氏常数（$K_m$）及最大反应速度（$V_{max}$）的测定：将底物稀释成不同浓度（5～6 个）分别与酶液在 30℃保温培养 30 min，加入显色剂终止反应。用 Enzfit 软件计算出 $K_m$ 和 $V_{max}$ 值。

**1.2.5** 酯酶同工酶电泳：采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳，具体方法根据 Devonshire（1977）并加以修改。分离胶浓度 7.5%，浓缩胶浓度 4%，恒压 100 V，电泳 6 h。将 0.2 g 固蓝 RR 盐溶于 200 mL 的磷酸缓冲液（pH 6.5）中，0.1 g α-NA、β-NA 溶于丙酮作底物，加到过滤后的固蓝 RR 盐溶液中对凝胶染色 10 min。

## 2 结果与分析

生物测定结果表明棉蚜抗性品系相对于敏感品系具有较高的抗性，抗性倍数为 17（表 1）。斜率分别为 4.295 和 6.154，斜率比较大说明种群的遗传学上纯度较高。

表 1 棉蚜不同品系对氧化乐果的敏感性

**Table 1 Susceptibility of different strains of cotton aphid to omethoate insecticide**

| 品系 Strains | 斜率 Slope | $LC_{50}$ （$mg \cdot mL^{-1}$） | 95% CL | 抗性倍数 Resistance factor |
|---|---|---|---|---|
| 敏感品系 susceptible strain | 4.295 | 29.48 | 8.13～25.999 | 1 |
| 抗性品系 resistant strain | 6.154 | 504.59 | 358.67～568.09 | 17.12 |

以 α-NA、α-NB 为底物测定时，敏感品系棉蚜羧酸酯酶的比活力分别为 9.46、2.93 μmol/（mg•min），显著高于抗性品系棉蚜［3.07、0.95 μmol/（mg•min）］。以 α-NA 为底物测定时，敏感品系棉蚜的 $K_m$ 和 $V_{max}$值明显高于抗性品系棉蚜的。当以 α-NP、β-NP 为底物测定时，两个品系棉蚜的羧酸酯酶比活力、$K_m$ 和 $V_{max}$没有显著差异（表 2）。

通过酯酶同工酶非变性聚丙烯酰胺电泳表明，棉蚜氧化乐果抗性品系和敏感品系均具有 5 条酯酶同工酶带，抗性品系的同工酶带活性明显低于敏感品系的（图 1～3）。

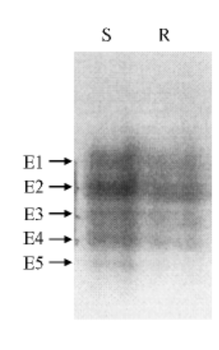



图 1 敏感、抗性棉蚜羧酸酯酶同工酶电泳

Fig. 1 Isozyme electrophoretic analyses of carboxylesterase in susceptible and resistant strains of cotton aphids

S：敏感品系 susceptible strain；R：抗性品系 resistant strain

表2 棉蚜抗性品系和敏感品系羧酸酯酶比活力、米氏常数和最大反应速度的比较

**Table 2 Comparison of carboxylesterase activity, $K_m$ and $V_{max}$ between resistant and susceptible strains of cotton aphid**

| 底物 Substrates | 羧酸酯酶比活力 Carboxylesterase activity[μmol/(mg·min)] | | 米氏常数 $K_m$ Michaelis constants(μmol·L$^{-1}$) | | 最大反应速度 $V_{max}$ Maximum velocities[μmol/(mg·min)] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 抗性品系 Resistant strain | 敏感品系 Susceptible strain | 抗性品系 Resistant strain | 敏感品系 Susceptible strain | 抗性品系 Resistant strain | 敏感品系 Susceptible strain |
| α-NA | 3.07 ± 0.15 a | 9.46 ± 0.06 b | $7.07\times10^{-1}$ ± $4.21\times10^{-6}$ a | 1.26 ± $1.26\times10^{-5}$ b | 5.03 ± 0.01 a | 25.37 ± 3.54 b |
| α-NB | 0.95 ± 0.08 a | 2.93 ± 0.23 b | $1.63\times10^{-1}$ ± $2.45\times10^{-6}$ a | $4.47\times10^{-1}$ ± $9.11\times10^{-6}$ a | 1.25 ± 0.28 a | 3.66 ± 0.85 a |
| α-NP | $3.86\times10^{-3}$ ± $1.04\times10^{-6}$ a | $4.45\times10^{-3}$ ± $2.08\times10^{-6}$ a | $9.74\times10^{-2}$ ± $6.27\times10^{-8}$ a | $5.72\times10^{-2}$ ± $5.48\times10^{-7}$ a | $4.27\times10^{-3}$ ± $3.12\times10^{-7}$ a | $5.12\times10^{-3}$ ± $1.66\times10^{-6}$ a |
| β-NP | $3.84\times10^{-3}$ ± $3.61\times10^{-7}$ a | $4.75\times10^{-3}$ ± $1.84\times10^{-6}$ a | $1.04\times10^{-1}$ ± $1.19\times10^{-7}$ a | $8.96\times10^{-2}$ ± $3.11\times10^{-6}$ a | $4.59\times10^{-3}$ ± $6.38\times10^{-7}$ a | $5.32\times10^{-3}$ ± $1.19\times10^{-6}$ a |

表中数据是平均值±标准误，数据后有不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。取三批酶液分别进行了3次重复。
The data are means ± *SD*. Different letters in the same row indicate a significant difference ($P<0.05$). Each analysis was replicated three times

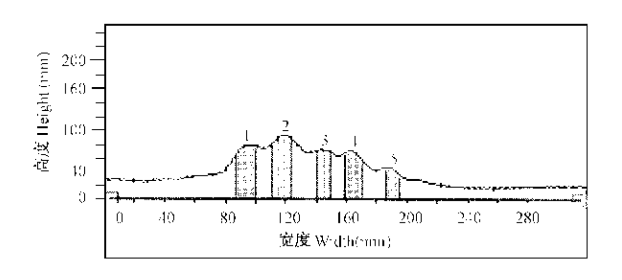



图2 敏感品系棉蚜羧酸酯酶同工酶扫描图
Fig. 2 Scan graph of carboxylesterase isozyme in the susceptible strain of cotton aphid

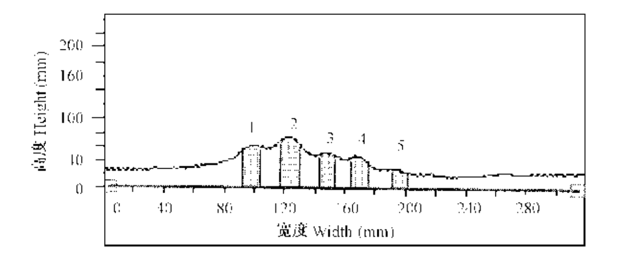



图3 抗性品系棉蚜羧酸酯酶同工酶扫描图
Fig. 3 Scan graph of carboxylesterase isozyme in the resistant strain of cotton aphid

## 3 讨论

结果表明棉蚜对氧化乐果产生抗性后，对羧酸酯酶的底物水解活性降低，而对磷酸酯酶的底物水解活性没有变化。棉蚜敏感品系羧酸酯酶对α-乙酸萘酯和α-丁酸萘酯的活性明显高于抗性品系，而对α-磷酸萘酯和β-磷酸萘酯的活性两个品系间没有显著差异；酯酶同工酶电泳也表明敏感品系5条同工酶带对α-乙酸萘酯的水解活性显著高于抗性品系的同工酶带。说明对氧化乐果产生抗性的棉蚜体内可能发生了"脂族酯酶突变"，即羧酸酯酶对其标准底物的水解活性降低，而对磷酸酯酶的底物水解活性增加或没有变化（Oppenoorth and van Asperen，1960）。van Asperen 和 Oppernoorth（1959）发现对马拉硫磷、对氧磷、对硫磷产生抗性的家蝇品系中羧酸酯酶（脂族酯酶）活性低于敏感品系，并提出了"脂族酯酶突变理论"。Silver（1984）用α-乙酸萘酯作底物，发现抗抗蚜威蚜虫的羧酸酯酶活性比敏感品系的低，认为羧酸酯酶活性升高不是这类蚜虫产生抗性的原因，这可能与抗蚜威属氨基甲酸酯类药剂有关。在对有机磷杀虫剂产生抗性的印度粉蛾 *Plodia interpunctella*（Beeman and Schmidt，1982）和铜绿蝇 *Lucilia cuprina*（Hughes and Raftos，1985）中同样发现了类似的现象。随后研究发现抗性铜绿蝇羧酸酯酶发生了5个氨基酸的突变，利用定点突变及体外表达的方法证明 Gly$^{137}$→Asp 的突变是导致抗性产生的原因（Newcomb *et al*.，1997）。

孙耘芹等（1987）研究表明棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的增加与α-乙酸萘酯羧酸酯酶活力的增加关系较大。O'Brien 等（1992）利用聚丙烯酰胺等电聚焦技术研究发现羧酸酯酶带型的不同是美国中南地区棉蚜产生抗性的原因。但是，我们对室内选育的棉蚜氧化乐果抗性品系和敏感品系对比研究表明，敏感品系的羧酸酯酶对其标准底物α-乙酸萘酯的水解能力显著高于抗性品系，对磷酸酯酶的底物α-磷酸萘酯和β-磷酸萘酯水解活性，两个品系间没有显著差异，这可能与品系的遗传背景和选育的药剂种类有关。我们对棉蚜氧化乐果抗性品系和敏感品系的羧酸酯酶基因克隆、表达进一步从本质上证明了该抗性品系的羧酸酯酶突变现象（待发表）。

## 参 考 文 献 （References）

Beeman R W, Schmidt B A, 1982. Biochemical and genetic aspects of malathion-specific resistance in the Indian meal moth. *J. Econ. Entomol.*, 75: 945－949.

Devonshire A L, 1975. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem.*, 167: 675－683.

Gao X W, Zheng B Z, 1990. Biochemical methods for detecting and monitoring insecticides resistance in melon-cotton aphid. *Acta Phytophylacica Sinica*, 17 (4): 373－376.［高希武，郑炳宗，1990. 生物化学法监测瓜-棉蚜田间种群的抗药性. 植物保护学报，17（4）：373－376］

Gong K Y, Zhang G L, Zhai G Y, 1964. Determination of cotton aphid resistance to '1059'. *Acta Entomol. Sin.*, 13 (1): 1－8.［龚坤元，张桂林，翟桂英，1964. 棉蚜对“1059”抗药性的测定. 昆虫学报，13（1）：1－8］

Hughes P B, Raftos D A, 1985. Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Bull. Entomol. Res.*, 75: 535－544.

Newcomb R D, Campbell P M, Ollis D L, Cheah E, Russell R J, Oakeshott J G, 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Genetics*, 94: 7 464－7 468.

O'Brien P J, Abdel-Aal Y A, Ottea J A, Graves J B, 1992. Relationship of insecticide resistance to carboxylesterase in *Aphis gossypii* from midsouth cotton. *J. Econ. Entomol.*, 85: 651－657.

Oppenoorth F J, van Asperen K, 1960. Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science*, 132: 298－299.

Silver A R J, 1984. The biochemical nature of pirimicarb resistance in two glasshouse strains of *Aphis gossypii* (Glover). *Aphids*, 2C: 129.

Sun Y Q, Feng G L, Yuan J G, Zhu P, Gong K Y, 1987. Biochemical mechanism of cotton aphid to organophosphorus insecticides. *Acta Entomol. Sin.*, 30 (1): 13－19.［孙耘芹，冯国蕾，袁家□，祝平，龚坤元，1987. 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生化机理. 昆虫学报，30（1）：13－19］

Tang Z H, 1983. Insecticide resistance and its countermeasure of agricultural pests in China. *Plant Protection*, 1: 22－24.［唐振华，1983. 我国农业害虫的抗药性及其对策. 植物保护，1：22－24］

van Asperen K, Oppenoorth F J, 1959. Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomol. Exp. Appl.*, 2: 48－57.

van Asperen K, 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8: 401－416.

Zheng B Z, Gao X W, Wang Z G, Liang T T, Cao B J, Gao H, 1989. Resistance mechanism of organophopsphorus and carbamate insecticides in *Aphis gossypii* (Glov.). *Acta Phytophylacica Sinica*, 16 (2): 131－137.［郑炳宗，高希武，王政国，梁同庭，曹本钧，高洪，1989. 瓜-棉蚜对有机磷及氨基甲酸酯杀虫剂抗性机制研究. 植物保护学报，16（2）：131－137］